

(19) **KG** (11) **480** (13) **C1**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО ПО НАУКЕ И (51)⁷ **A61K 35/76**
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ ПРИ
ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к предварительному патенту Кыргызской Республики

(21) 20000025.1

(22) 04.04.2000

(46) 01.11.2001, Бюл. №10

(76) Нургазиев Р.З., Биримкулова А.Т., Зиядинов И.К. (KG)

(56) А.с. SU №1220179, кл. A61K 39/265; C12N 7/00, 1984

(54) Штамм вируса Herpesvirus Bovis I БГР-98, используемый для получения инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и диагностического препарата

(57) Изобретение относится к вирусологии и может быть использовано для получения биологического препарата в борьбе с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота. Задача изобретения - получение более эффективного штамма для приготовления инактивированной вакцины и диагностического препарата против вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Штамм Herpesvirus BOVIS 1 БГР-98 выделен из носовых смывов больных телят с клиническими признаками инфекционного ринотрахеита в хозяйствах Чуйской долины. Штамм позволит разработать вакцинные препараты для специфической профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота, а также диагностический препарат для проведения своевременных диагностических работ и является безвредным для окружающей среды. 2 табл., 2 пр.

Изобретение относится к ветеринарной вирусологии и может быть использовано для изготовления биологического препарата, в частности, вакцины с целью профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота.

Известен штамм вируса Bovid Herpes Virus ВГНКИ №18, используемый для контроля иммуногенности вакцин против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, полученный экспериментально из исходного полевого штамма ТНЛ-2 вируса ИРТ крупного рогатого скота путем серийных и серийно-чередующихся пассажей через организм лабораторных животных (беспородные золотистые сирийские хомяки и белые мыши) (А.с. SU №1220179, кл. A61K 39/265; C12N 7/00, 1984).

Данный штамм обладает следующими свойствами.

Морфологические свойства

ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Herpes viridae. Капсид имеет икосаэдрическую форму, диаметр его равен 110 нм, состоит из 162 капсомеров. Вирионы

покрыты липопротеидной оболочкой и имеют диаметр около 120-220 нм.

Культуральные свойства

Штамм размножается и поддерживается в культурах клеток бычьего происхождения: тестикул бычков, почек эмбрионов коровы, почек телят и их субкультурах, вызывая отчетливые ЦПД и, накапливаясь в титре до 10^{5-7} ТЦД_{50/мл}, нейтрализуется специфической сывороткой.

Штамм обладает патогенностью для лабораторных животных (беспородные золотистые сирийские хомяки и белые мыши) при подкожном и интрацеребральном способах введения и вызывает их гибель или переболевание. У больных животных отмечается гиперемия слизистых оболочек носовой полости и конъюнктивиты. Гибель животных отмечается на 2-10 сутки после заражения. При вскрытии трупов павших животных отмечается увеличение размера легких, скопление пенистой жидкости в трахее и бронхах, увеличение подчелюстных и заглоточных лимфатических узлов, отечность слизистых оболочек тонкого и толстого кишечника. Животные, иммунизированные вирусвакциной против ИРТ крупного рогатого скота различными способами, после контрольного заражения штаммом Bovid Herpes Virus ВГНКИ № 18 не погибают, в то время, как смертность среди неиммунизированных животных составляет 70-100 %.

Недостатком штамма является его быстрая инаktivация и низкая иммуногенность.

Задачей изобретения является получение более эффективного вакцинного штамма для приготовления биологических препаратов (вакцины и диагностикума) с целью борьбы и профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.

Штамм Herpesvirus Bovis 1 БГР-98 выделен из носовых смывов больных животных (телят) с клиническими признаками респираторного заболевания в учебно-опытном хозяйстве Кыргызской аграрной академии - СОХ (Сокулукское опытное хозяйство).

Штамм Herpesvirus Bovis 1 БГР-98 характеризуется следующими культурально-морфологическими и иммунобиологическими свойствами.

Морфологические признаки

Вирион имеет икосаэдрическую симметрию и состоит из капсида диаметром от 120-150 нм. Капсид содержит около 162 частично полых капсомера, которая окружает ядро вируса из ДНК.

Геном вируса состоит из двухспиральной ДНК, где в основном преобладают гуанин и цитозин (30-70 %).

Культуральные свойства

Штамм вируса Herpesvirus Bovis 1 БГР-98 хорошо репродуцирует на перевиваемой линии культуры клеток легких эмбриона коровы (ЛЭК) и почек эмбриона коровы (ПЭК).

Вышеназванные культуры клеток хорошо растут в питательных средах ИГЛА, содержащих 5 % сыворотки крови крупного рогатого скота (телят) при температуре 37°C.

На культуре клеток ЛЭК после инфицирования через 48-72 часов штамм вируса Herpesvirus Bovis 1 БГР-98 проявляет характерное цитопатическое действие (ЦПД) для семейства Нефе. Монослой клетки разрушается, форма клеток меняется, приобретая округленную форму, клетки теряют адгезивность и свободно плавают в питательной среде. На 2-3 дни наблюдается 50 %-е ЦПД в монослое, а на 4-й день 100 %-е ЦПД в монослое.

Характер цитопатических изменений в зараженной культуре клеток ПЭК, вызванных выделенными изолятами, сходен с изменениями, наблюдаемыми в культуре клеток ЛЭК после заражения штаммом вируса Herpesvirus Bovis 1 БГР-98: по краям монослоя наблюдается дегенерация клеток, затем появляются единичные скопления округлых клеток по всему монослою, которые, укрупняясь и отделяясь друг от друга, образуют зернистость цитоплазмы.

Штамм вируса Herpesvirus Bovis 1 БГР-98 выделен в основном в 3-4 пассажах, ЦПД наблюдали через 72-96 часов. Титр изолятов от пассажа к пассажу повышается с 10 до 1000 ТЦД_{50/мл} во втором пассаже и достигает 1.0-10 млн ТЦД_{50/мл} в последующих

пассажах.

Иммунобиологические свойства

В результате исследования культуры клеток инфицированной изолятами и эталонным штаммом Madin обнаружено следующее: в культуре клеток ЛЭК зараженной вирусом Madin и окрашенной специфической меченой сывороткой, через 18-24 часов обнаруживается характерная внутриядерная флуоресценция, которая через 6 часов становится интенсивнее. Такая же картина повторяется при исследовании в сыворотке РИФ (реакция иммунофлуоресценции) изолятов Herpesvirus Bovis 1 БГР-98, выделенных из носовых смывов (см. табл 1).

Таблица 1

Результаты исследования изолятов в
сыворотке реакции иммунофлуоресценции

Штамм, изолят	Материал, из которой выделен изолят	Флуоресцирующие сыворотки к вирусу инфекционного ринотрахеита КРС
Madin	эталон	+
1	смыв с носовой полости	+
2	смыв с носовой полости	+
3	смыв с носовой полости	+
4	смыв с носовой полости	+
5	легкие	-
6	дефибринированная кровь	-
7	лимфатические узлы	-
8	печень	-
9	трахея	-

Обозначения: + - проявление реакции флуоресценции
- - отсутствие реакции.

Таблица 2

Результаты идентификации полевых изолятов

№ проб	ВНУ1		ВНУ2		ВНУ3	
	РН	РИФ	РН	РИФ	РН	РИФ
1	+	+	—	—	—	—
2	+	+	—	—	—	—
3	+	+	—	—	—	—
4	+	+	—	—	—	—
5	+	—	—	—	—	—
6	+	—	—	—	—	—
7	+	—	—	—	—	—
8	+	—	—	—	—	—
9	+	—	—	—	—	—

При исследовании изолятов в реакции нейтрализации с позитивной сывороткой наблюдается нейтрализация выделенных изолятов антителами (табл. 2).

Для установления типовой принадлежности выделенных изолятов антителами были получены специфические сыворотки. Для получения специфических сывороток использовали кроликов, у которых наблюдали повышение инфекционной активности на 0.80-1.85 log₂ по сравнению с исходной инфекционной активностью.

Титр сывороток, полученных на полевых изолятах в реакции нейтрализации с гомологичными вирусами, достигал 6.0-7.0 log₂.

Устойчивость выделенных изолятов к эфиру.

Выделенные изоляты *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98 оказались устойчивыми, т.е. практически нечувствительны к эфиру: титр их после обработки эфиром не изменился.

Преимущества изобретенного по сравнению с известными штаммами состоят в том, что штамм *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98 позволит разработать вакцинные препараты для специфической профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом крупного рогатого скота, а также создать препарат для диагностики этого заболевания. Безвреден для окружающей среды.

Пример 1. Получение вакцин из штамма вируса *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98

Вакцину против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота готовят следующим образом:

Штамм вируса инфекционного ринотрахеита *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98 выращивают в культуре клеток ЛЭК в монослое в 1.5 литровых матрасах при 37°C в термостате с содержанием 0.4 % CO₂ с использованием среды ИГЛА содержащий 5 % бычьей сыворотки при pH 7.2-7.4.

Полученную вирусосодержащую суспензию с титром вируса 10^{7.0} ТЦД_{50/мл} сливают в емкость, обрабатывают ультразвуком 30 с и добавляют 37 % раствор формалина (на 100 мл вирусного раствора добавляют 1.5 мл формалина).

Контакт данной суспензии вируса с формалином при 37°C составляет 6 ч. После чего суспензия подвергается диализу в 0.9 % физиологическом растворе 27 часов при температуре +4°, которая предусматривает нейтрализацию инактивированного действия формалина. Диализированная суспензия вируса сливается в сосуд, измеряется объем и добавляется к нему такой же объем гидроокиси алюминия Al(OH)₃.

Смесь диспергируется в течение 10 минут и разливается во флаконы по 5 мл и хранится при температуре 4°C. Готовая вакцина представляет собой стойкую смесь розового цвета.

Параллельно проводится контроль на стерильность в различных питательных средах аэробов и анаэробов, инактивацию вируса на культуре клеток. Титр вируса проверяется до инактивации.

Пример 2. Использование штамма вируса *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98 как диагностического препарата

Штамм вируса против ИРТ с титром 10^{7.0} ТЦД_{50/мл} хранится при -70°C и размораживается перед постановкой реакции нейтрализации (РН) для обнаружения антител против вируса инфекционного ринотрахеита в сыворотках крови крупного рогатого скота.

Для проведения РН необходимо:

1. Инактивировать исследуемые сыворотки при 56°C в течение 30 мин.
2. Подготовить 2-кратное разведение исследуемых сывороток. Реакция нейтрализации проводится следующим образом.

К разведенным сывороткам добавляется разведенный вирус штамма вируса *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98 10⁻³ ТЦД_{50/мл} и оставляется для контакта в течение 60-ти минут при 37°C в термостате. По истечении времени к каждой пробе добавляется такое же количество подготовленной суспензии клеточных культур (ЛЭК) и такая система оставляется в термостате при t=37°C, содержащая 0.4 % CO₂ в течение 48-72 часов.

По истечении времени проводится счет реакции. В серопозитивных пробах, где произошла нейтрализация антителами антигенов ИРТ, не наблюдается ЦПД вирусов на культуру клеток ЛЭК.

В серонегативных пробах, где не было гомологичных антител, антигены не были нейтрализованы и оказали цитопатическое действие на культуру клеток ЛЭК. Наблюдается ЦПД. Таким образом, проводится диагностика на наличие или отсутствие антител против вируса ИРТ в исследуемом материале используя вирус штамма вируса *Herpesvirus Bovis* 1 БГР-98.

Формула изобретения

Штамм вируса Herpesvirus Bovis 1 БГР-98, используемый для получения инаktivированной вакцины против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и диагностического препарата.

Составитель описания

Никифорова М.Д.

Ответственный за выпуск

Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03